

**PCT**  
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
 Internationales Büro  
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



<b>(51) Internationale Patentklassifikation:</b>  Nicht klassifiziert	<b>A2</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:</b> <b>WO 89/11211</b>  <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 30. November 1989 (30.11.89)		
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none; vertical-align: top;"> <b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b>    PCT/EP89/00579   <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b>    24. Mai 1989 (24.05.89)   <b>(30) Prioritätsdaten:</b>                P 38 17 591.6                      24. Mai 1988 (24.05.88)                      DE   <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH (GBF) [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig (DE).   <b>(72) Erfinder; und</b>  <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> BLÖCKER, Helmut [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig (DE).   <b>(74) Anwalt:</b> BOETERS, Hans. D.; Thomas-Wimmer-Ring 14, D-8000 München (DE).         </td> <td style="width: 50%; border: none; vertical-align: top;"> <b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.   <b>Veröffentlicht</b>  <i>Mit einer Erklärung gemäss Artikel 17 Absatz 2(a).            Ohne Klassifikation und ohne Zusammenfassung; Bezeichnung von der Internationalen Recherchenbehörde nicht überprüft.</i> </td> </tr> </table>			<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP89/00579  <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 24. Mai 1989 (24.05.89)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> P 38 17 591.6                      24. Mai 1988 (24.05.88)                      DE  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH (GBF) [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> BLÖCKER, Helmut [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig (DE).  <b>(74) Anwalt:</b> BOETERS, Hans. D.; Thomas-Wimmer-Ring 14, D-8000 München (DE).	<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit einer Erklärung gemäss Artikel 17 Absatz 2(a).            Ohne Klassifikation und ohne Zusammenfassung; Bezeichnung von der Internationalen Recherchenbehörde nicht überprüft.</i>
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP89/00579  <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 24. Mai 1989 (24.05.89)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> P 38 17 591.6                      24. Mai 1988 (24.05.88)                      DE  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH (GBF) [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> BLÖCKER, Helmut [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig (DE).  <b>(74) Anwalt:</b> BOETERS, Hans. D.; Thomas-Wimmer-Ring 14, D-8000 München (DE).	<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit einer Erklärung gemäss Artikel 17 Absatz 2(a).            Ohne Klassifikation und ohne Zusammenfassung; Bezeichnung von der Internationalen Recherchenbehörde nicht überprüft.</i>			
<b>(54) Title:</b> OLIGONUCLEOTIDE BANK AND PROCESS FOR DNA SEQUENCING  <b>(54) Bezeichnung:</b> OLIGONUCLEOTIDBANK UND VERFAHREN ZUR DNA-SEQUENZIERUNG				

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FI	Finnland	MR	Mauritanien
AU	Australien	FR	Frankreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GA	Gabon	NL	Niederlande
BE	Belgien	GB	Vereinigtes Königreich	NO	Norwegen
BF	Burkina Faso	HU	Ungarn	RO	Rumänien
BG	Bulgarien	IT	Italien	SD	Sudan
BJ	Benin	JP	Japan	SE	Schweden
BR	Brasilien	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SU	Sowjet Union
CG	Kongo	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CH	Schweiz	LK	Sri Lanka	TG	Togo
CM	Kamerun	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE	Deutschland, Bundesrepublik	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		
ES	Spanien	ML	Mali		

## Oligonucleotidbank und Verfahren zur DNA-Sequenzierung

Die Sequenzanalyse von Nucleinsäurefragmenten, insbesondere von DNA, ist als ein Schlüsselverfahren der modernen Biowissenschaften und der modernen Biotechnologie anzusehen. In letzter Zeit gerät mit der ständigen Verfeinerung der Sequenzierungstechniken auch die Analyse von ganzen, komplexen Genomen in den Bereich des Möglichen.

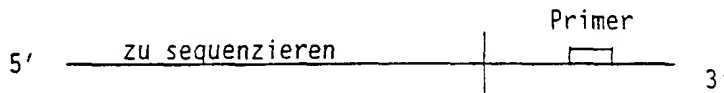
Neben einigen weniger populären Methoden werden heutzutage vor allem zwei grundsätzlich unterschiedliche Methoden zur Sequenzanalyse angewandt, und zwar

- die Sequenzierung durch chemische Modifizierung und Abbau (Maxam/Gilbert-Methode) sowie
- die Sequenzierung durch kontrollierten Polymerase-Einbau unterschiedlicher Nucleotide (Sanger-Methode); vgl. beispielsweise Gassen & Schäfer, Sequenzbestimmung von Nucleinsäuren und Proteinen, in: Gassen et al, Gentechnik, 2. Auflage, Gustav-Fischer-Verlag, 1987, Seite 241 ff.

Die Sanger-Methode kann sowohl mit einzelsträngiger DNA, die speziell für den Zweck der Sequenzierung hergestellt wird, als auch seit wenigen Jahren mit jeder ausreichend reinen doppelsträngigen DNA durchgeführt werden. Ein durchgehendes Wesensmerkmal der Sanger-Methode bleibt jedoch unter anderem die Abhängigkeit der verwendeten Einbauenzyme (DNA-Polymerasen) sowohl von einer Matrize (Templat = zu sequenzierende DNA) als auch von einem Startmolekül (Primer). Der Primer ist in der Regel ein kurzes, chemisch synthetisiertes Oligonucleotid, das in seiner

- 2 -

ganzen Länge zu einem 3' von dem zu sequenzierenden DNA-Abschnitt gelegenen Teilstück basenkomplementär ist:



Die Anheftungsstelle (Hybridisierungsstelle) des Primers muß derart gewählt sein, daß unter den experimentellen Bedingungen der Primer nur die gewünschte und keine einzige weitere Anheftungsstelle findet, um ein lesbares Sequenzierungsergebnis erreichen zu können. Die Spezifität des Primers hängt direkt von seiner Länge und der Komplexität der im Experiment verwendeten DNA ab. Aus statistischen Erwägungen und praktischer Erfahrung ergibt sich, daß Primer mit einer Kettenlänge von bis zu 24 Basen für alle denkbaren Fälle ausreichen sollten.

Bei der Sequenzanalyse sehr langer DNA (beispielsweise bei Genomsequenzierungen) werden gegenwärtig im wesentlichen zwei verschiedene Strategien verfolgt.

Strategie 1: Die Ein-Primer-Methode. Hierbei wird die zu sequenzierende DNA (je nach Verfahrensvariante) mehr oder weniger in Zufallsfragmente oder teilweise geordnete Fragmente zerlegt, wonach die Fragmente in ein und denselben Vektor inseriert werden. Nach Transformation von Zellen werden DNA-Präparationen von einzelnen Klonen hergestellt und der Sequenzanalyse unterworfen. Da sich alle DNA-Präparationen maximal um die inserierte DNA unterscheiden, kann für alle anstehenden Sequenzanalysen im Prinzip ein einziger Primer verwendet werden, der beispielsweise direkt neben der Insertionsstelle auf der Vektor-DNA hybridisiert. Diesem Vorteil stehen jedoch auch erhebliche Nachteile gegenüber,

- 3 -

- denn da die Klone zufällig ausgesucht werden müssen, werden einzelne Abschnitte der Original-DNA sehr oft weit häufiger als nötig sequenziert, und

- schließlich klaffen in der mit Hilfe von geeigneten Computer-Programmen zu einer Gesamtsequenz geordneten Sammlung der Teilsequenzierungsergebnisse häufig beträchtliche Lücken, da beispielsweise gewisse Abschnitte der zu analysierenden Original-DNA "schwer klonierbar" sind.

Strategie 2: Die Mehr-Primer-Methode. Die zu sequenzierende DNA wird hier nicht wie bei Strategie 1 nach der Schrotschuß-Methode, sondern gezielt progressierend analysiert. Der in einem Experiment noch sicher zu entschlüsselnde Sequenzabschnitt dient zur Auswahl einer Primer-Anheftungsstelle für das nächste Experiment und so fort. Der Vorteil dieser Methode liegt vor allem darin, daß unnötige Mehrfachsequenzanalysen wie bei der Strategie 1 vermieden werden. Der wohl wesentliche Grund, warum diese Methode nicht allein für die Analyse langer DNA-Abschnitte verwendet wird, liegt in der Beschränkung durch die gegenwärtig verfügbaren Methoden zur chemischen DNA-Synthese.

Es hat nicht an Versuchen gefehlt, die jeweiligen Nachteile der oben beschriebenen Verfahren zu mildern, beispielsweise durch das "Multiplex-Sequencing" bei Strategie 1 und das simultane progressierende Sequenzieren von verschiedenen Stellen aus bei Strategie 2. Ein Weg, den wesentlichen Nachteil der Strategie 2 ganz zu beseitigen, liegt theoretisch darin, eine Bank aller denkbaren Primer anzulegen. Dies ist jedoch durch direkte chemische Synthese praktisch nicht möglich, da es allein  $4^{24}$  verschiedene Primer der Kettenlänge 24 gibt.

Erfindungsgemäß wird daher vorgeschlagen, kürzere, chemisch synthetisierte Oligonucleotide zu verwenden. Da jede längere Sequenz im Prinzip aus zwei oder mehr kürzeren Sequenzen zusammensetzbar ist, werden die dem gewünschten Primer entsprechenden

kurzen Oligonucleotide anstelle des gewünschten Primers zu der zu sequenzierenden DNA gegeben und durch eine

geeignete Prozedur, beispielsweise mit T4-DNA-Ligase, zu dem gewünschten Primer zusammengefügt. Die Sequenzierungsreaktion kann dann anschließend praktisch unter Standardbedingungen durchgeführt werden.

Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe wird durch die Gegenstände der Ansprüche gelöst.

#### Beispiel 1

In typischen Experimenten wurden ca. 2,5 pMol DNA des Plasmids pTZ18R (Pharmacia-LKB) mit NaOH denaturiert, mit Ethanol gefällt, getrocknet und in Wasser aufgenommen. Die DNA-Lösung wurde mit je 2,5 pMol zweier verschiedener Oligonucleotidlösungen versetzt. Die Oligonucleotide der Kettenlänge 8 (Octamere) waren derart gewählt, daß sie unmittelbar benachbart auf einem Abschnitt bekannter Nucleotidsequenz der Plasmid-DNA hybridisieren konnten. Das 5'-Ende des im hybridisierten Zustand benachbart zum 3'-Ende des anderen Oligonucleotids gelegenen Octamers war zuvor nach gängigen Verfahren mit T4-Polynucleotid-Kinase und ATP phosphoryliert worden. Nach Einstellen der bekannten Pufferbedingungen für Ligationen mit T4-DNA-Ligase und Versetzen mit 1 Einheit des Enzyms wurde die Lösung (10 µl Endvolumen) 4 h lang bei 15 °C inkubiert. Diese Ligationslösung wurde vor der Sequenzierung 5 min lang bei 37 °C aufbewahrt, um möglichst viele durch Ligation entstandene 16-mere und möglichst wenige 8-mere hybridisieren zu lassen.

Die folgende Sequenzierung sollte dazu dienen, die Sequenz des gewählten Vektors zu überprüfen. Für die Sequenzierungsreaktion nach dem Standardprotokoll der Firma United States Biochemical Corporation (USB) wurden 8 µl der Ligationslösung eingesetzt. Abweichend von diesem Protokoll wurde auf das "Annealing" von Templat und Primer verzichtet.

Sofern die genannte Phosphorylierung in Gegenwart von [gamma-<sup>32</sup>P]ATP durchgeführt worden war, wurde auf die spätere Verwendung von [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP verzichtet.

-6-

## Patentansprüche

1. Oligonucleotidbank, umfassend alle denkbaren  $4^6$  verschiedenen hexameren Oligonucleotide.
2. Oligonucleotidbank, umfassend alle denkbaren  $4^7$  verschiedenen heptameren Oligonucleotide.
3. Oligonucleotidbank, umfassend alle denkbaren  $4^8$  verschiedenen octameren Oligonucleotide.
4. Oligonucleotidbank, umfassend alle denkbaren  $4^9$  verschiedenen Oligonucleotide.
5. Verfahren zur DNA-Sequenzierung nach der Mehr-Primer-Methode, dadurch **gekennzeichnet**, daß man
  - (a) bei der zu sequenzierenden DNA eine einzelsträngige Primeranheftungsstelle bekannter Sequenz wählt,
  - (b) auf dieser Primeranheftungsstelle unmittelbar benachbart zwei hexamere, heptamere oder octamere Oligonucleotide (beispielsweise einer Oligonucleotidbank gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 4) hybridisiert und
  - (c) ggf. gleichzeitig mit Stufe (b) oder nach Stufe (b) ein weiteres hexameres, heptameres oder octameres Oligonucleotid (beispielsweise einer Oligonucleotidbank gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 4) unmittelbar benachbart zu



- 7 -

einem der beiden anderen Oligonucleotide auf der Primeranheftungsstelle hybridisiert und

(d) die Oligonucleotide zu einem Primer ligiert.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch *gekennzeichnet*, daß man auf der Primeranheftungsstelle zwei Oligonucleotide hybridisiert und miteinander zu einem Prä-Primer ligiert und erst danach auf der Primeranheftungsstelle ein drittes Oligomeres hybridisiert und mit dem Prä-Primer ligiert.

7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, dadurch *gekennzeichnet*, daß man für die Primerbildung hexamere, heptamere und/oder octamere Oligonucleotide verwendet.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch *gekennzeichnet*, daß man Oligonucleotide verwendet, die an ihrem 5'-Ende, sofern dieses Ende mit einem benachbarten Oligonucleotid mit Hilfe von T4-DNA-Ligase ligiert werden soll, phosphoryliert sind.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch *gekennzeichnet*, daß man nach der Ligation und vor der Sequenzierung nicht zum gewünschten Primer ligierte Oligonucleotide durch Wärmebehandlung entfernt.

# PATENT COOPERATION TREATY

## DECLARATION OF NON-ESTABLISHMENT OF INTERNATIONAL SEARCH REPORT

issued pursuant to PCT Article 17(2)(a) <sup>(1)</sup>

<b>IDENTIFICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION</b>	<b>APPLICANT'S OR AGENT'S FILE REFERENCE</b> 5352-GBF
International Application No. PCT/EP 89/00579	International Filing Date 24 May 1989
Receiving Office RO/EP	Priority Date Claimed 24 May 1988
Applicant (Name) GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG mbH (GBF) et al.	Int. Cl. <sup>4</sup> C 12 N 15/00 C 12 Q 1/68
<b>DECLARATION</b>	
<p>This International Searching Authority hereby declares that no international search report will be established on the above-identified international application for the reasons indicated below. <sup>(1)</sup></p> <p>1. The subject matter of the international application relates to: <sup>(2)</sup></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>a. <input type="checkbox"/> scientific theories.</li> <li>b. <input type="checkbox"/> mathematical theories.</li> <li>c. <input type="checkbox"/> plant varieties.</li> <li>d. <input type="checkbox"/> animal varieties.</li> <li>e. <input type="checkbox"/> essentially biological processes for the production of plants and animals, other than microbiological processes and the products of such processes.</li> <li>f. <input type="checkbox"/> schemes, rules or methods of doing business.</li> <li>g. <input type="checkbox"/> schemes, rules or methods of performing purely mental acts.</li> <li>h. <input type="checkbox"/> schemes, rules or methods of playing games.</li> <li>i. <input type="checkbox"/> methods for treatment of the human body by surgery or therapy.</li> <li>j. <input type="checkbox"/> methods for treatment of the animal body by surgery or therapy.</li> <li>k. <input type="checkbox"/> diagnostic methods.</li> <li>l. <input type="checkbox"/> mere presentations of information.</li> <li>m. <input type="checkbox"/> computer programs for which this International Searching Authority is not equipped to search prior art.</li> </ul> <p>2. <input checked="" type="checkbox"/> The failure of the following parts of the international application to comply with prescribed requirements prevents a meaningful search from being carried out: <sup>(3)</sup></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>a. <input type="checkbox"/> the description.</li> <li>b. <input checked="" type="checkbox"/> the claims.</li> <li>c. <input type="checkbox"/> the drawings.</li> </ul> <p>comment: Art. 17.2(a)(ii) The patent claims are not fully supported by the description.</p>	
<b>CERTIFICATION</b>	
International Searching Authority European Patent Office	Date of Mailing 12 September 1989 (12.09.89)
Authorized Officer	

**VERFAHREN ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

**ERKLÄRUNG ÜBER DIE NICHTERSTELLUNG EINES INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHTS**  
gemäß Artikel 17 Absatz 2 Buchstabe a PCT<sup>1</sup>

<b>KENNZEICHNUNG DER INTERNATIONALEN ANMELDUNG</b>	<b>AKTENZEICHEN DES ANMELDERS ODER ANWALTS</b> 5352-GBF
<small>Internationales Aktenzeichen</small> PCT/EP 89/00579	<small>Internationales Anmeldedatum</small> 24. Mai 1989
<small>Anmeldeamt</small> RO/EP	<small>Beanspruchtes Prioritätsdatum</small> 24. Mai 1988
<small>Anmelder (Name)</small> GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG mbH (GBF) et al.	<small>Klassifikation der Anmeldung</small> (int. Cl <sup>4</sup> ) C 12 N 15/00 C 12 Q 1/68
<b>ERKLÄRUNG</b>	
<p>Die Internationale Recherchenbehörde erklärt hiermit, daß für die oben genannte internationale Anmeldung aus den nachstehenden Gründen kein internationaler Recherchenbericht erstellt wird.<sup>1</sup></p> <p>1. Der Gegenstand der internationalen Anmeldung betrifft folgende Gebiete:<sup>2</sup></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>a. <input type="checkbox"/> wissenschaftliche Theorien.</li> <li>b. <input type="checkbox"/> mathematische Theorien.</li> <li>c. <input type="checkbox"/> Pflanzensorten.</li> <li>d. <input type="checkbox"/> Tierarten.</li> <li>e. <input type="checkbox"/> im wesentlichen biologische Verfahren zur Züchtung von Pflanzen und Tieren mit Ausnahme mikrobiologischer Verfahren und der mit Hilfe dieser Verfahren gewonnenen Erzeugnisse.</li> <li>f. <input type="checkbox"/> Pläne, Regeln und Verfahren für eine geschäftliche Tätigkeit.</li> <li>g. <input type="checkbox"/> Pläne, Regeln und Verfahren für rein gedankliche Tätigkeiten.</li> <li>h. <input type="checkbox"/> Pläne, Regeln und Verfahren für Spiele.</li> <li>i. <input type="checkbox"/> Verfahren zur chirurgischen oder therapeutischen Behandlung des menschlichen Körpers.</li> <li>j. <input type="checkbox"/> Verfahren zur chirurgischen oder therapeutischen Behandlung des tierischen Körpers.</li> <li>k. <input type="checkbox"/> Diagnostizierverfahren.</li> <li>l. <input type="checkbox"/> bloße Wiedergabe von Informationen.</li> <li>m. <input type="checkbox"/> Programme von Datenverarbeitungsanlagen, für die die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Durchführung einer Recherche über den Stand der Technik ausgerüstet ist.</li> </ul> <p>2. <input checked="" type="checkbox"/> Die folgenden Teile der internationalen Anmeldung entsprechen den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig, daß eine sinnvolle Recherche nicht durchgeführt werden kann:<sup>3</sup></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>a. <input type="checkbox"/> die Beschreibung.</li> <li>b. <input checked="" type="checkbox"/> die Ansprüche.</li> <li>c. <input type="checkbox"/> die Zeichnungen.</li> </ul> <p>Bemerkungen: Art. 17.2 (a)(ii) Die Patentansprüche werden nicht in vollen Umfang durch die Beschreibung gestützt.</p>	
<b>BESCHEINIGUNG</b>	
<small>Internationale Recherchenbehörde</small>  <b>EUROPÄISCHES PATENTAMT</b> Zweigstelle in Den Haag P.B. 5818 Patentlaan, 2 2280 HV RIJSWIJK (ZH) / Niederlande Telex 31651 (070) 40-2040 BREV/PATENT	<small>Absenddatum</small>  <div style="font-size: 1.2em; font-weight: bold;">12 SEP. 1989</div>
<small>Bevollmächtigter Bediensteter</small>  <div style="text-align: right; font-size: 1.2em; font-weight: bold;">T.K. WILLIS</div>	



**PCT**  
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>4</sup> : C12Q 1/68, C12N 15/00		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 89/11211</b> (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 30. November 1989 (30.11.89)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP89/00579 (22) Internationales Anmeldedatum: 24. Mai 1989 (24.05.89) (30) Prioritätsdaten: P 38 17 591.6        24. Mai 1988 (24.05.88)        DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): GESELL- SCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FOR- SCHUNG MBH (GBF) [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BLÖCKER, Helmut [DE/ DE]; Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig (DE). (74) Anwalt: BOETERS, Hans, D.; Thomas-Wimmer-Ring 14, D-8000 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (euro- päisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (euro- päisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (euro- päisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (euro- päisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäi- sches Patent), US. Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassen Frist Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen. (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchen- berichts: 8. März 1990 (08.03.90)	
(54) Title: OLIGONUCLEOTIDE BANK AND PROCESS FOR DNA SEQUENCING (54) Bezeichnung: OLIGONUCLEOTIDBANK UND VERFAHREN ZUR DNA-SEQUENZIERUNG (57) Abstract Oligonucleotide bank and process for DNA sequencing according to the multi-primer method. (57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft eine Oligonucleotidbank und ein Verfahren zur DNA-Sequenzierung nach der Mehr-Primer-Methode.			

# *LEDIGLICH ZUR INFORMATION*

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	ES	Spanien	ML	Mali
AU	Australien	FI	Finnland	MR	Mauritanien
BB	Barbados	FR	Frankreich	MW	Malawi
BE	Belgien	GA	Gabon	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GB	Vereinigtes Königreich	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	RO	Rumänien
BJ	Benin	IT	Italien	SD	Sudan
BR	Brasilien	JP	Japan	SE	Schweden
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SU	Sowjet Union
CG	Kongo	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CH	Schweiz	LK	Sri Lanka	TG	Togo
CM	Kamerun	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE	Deutschland, Bundesrepublik	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		

### Oligonucleotidbank und Verfahren zur DNA-Sequenzierung

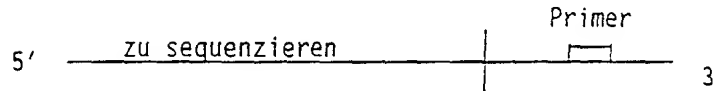
Die Sequenzanalyse von Nucleinsäurefragmenten, insbesondere von DNA, ist als ein Schlüsselverfahren der modernen Biowissenschaften und der modernen Biotechnologie anzusehen. In letzter Zeit gerät mit der ständigen Verfeinerung der Sequenzierungstechniken auch die Analyse von ganzen, komplexen Genomen in den Bereich des Möglichen.

Neben einigen weniger populären Methoden werden heutzutage vor allem zwei grundsätzlich unterschiedliche Methoden zur Sequenzanalyse angewandt, und zwar

- die Sequenzierung durch chemische Modifizierung und Abbau (Maxam/Gilbert-Methode) sowie
- die Sequenzierung durch kontrollierten Polymerase-Einbau unterschiedlicher Nucleotide (Sanger-Methode); vgl. beispielsweise Gassen & Schäfer, Sequenzbestimmung von Nucleinsäuren und Proteinen, in: Gassen et al, Gentechnik, 2. Auflage, Gustav-Fischer-Verlag, 1987, Seite 241 ff.

Die Sanger-Methode kann sowohl mit einzelsträngiger DNA, die speziell für den Zweck der Sequenzierung hergestellt wird, als auch seit wenigen Jahren mit jeder ausreichend reinen doppelsträngigen DNA durchgeführt werden. Ein durchgehendes Wesensmerkmal der Sanger-Methode bleibt jedoch unter anderem die Abhängigkeit der verwendeten Einbauenzyme (DNA-Polymerasen) sowohl von einer Matrize (Templat = zu sequenzierende DNA) als auch von einem Startmolekül (Primer). Der Primer ist in der Regel ein kurzes, chemisch synthetisiertes Oligonucleotid, das in seiner

ganzen Länge zu einem 3' von dem zu sequenzierenden DNA-Abschnitt gelegenen Teilstück basenkomplementär ist:



Die Anheftungsstelle (Hybridisierungsstelle) des Primers muß derart gewählt sein, daß unter den experimentellen Bedingungen der Primer nur die gewünschte und keine einzige weitere Anheftungsstelle findet, um ein lesbares Sequenzierungsergebnis erreichen zu können. Die Spezifität des Primers hängt direkt von seiner Länge und der Komplexität der im Experiment verwendeten DNA ab. Aus statistischen Erwägungen und praktischer Erfahrung ergibt sich, daß Primer mit einer Kettenlänge von bis zu 24 Basen für alle denkbaren Fälle ausreichen sollten.

Bei der Sequenzanalyse sehr langer DNA (beispielsweise bei Genomsequenzierungen) werden gegenwärtig im wesentlichen zwei verschiedene Strategien verfolgt.

Strategie 1: Die Ein-Primer-Methode. Hierbei wird die zu sequenzierende DNA (je nach Verfahrensvariante) mehr oder weniger in Zufallsfragmente oder teilweise geordnete Fragmente zerlegt, wonach die Fragmente in ein und denselben Vektor inseriert werden. Nach Transformation von Zellen werden DNA-Präparationen von einzelnen Klonen hergestellt und der Sequenzanalyse unterworfen. Da sich alle DNA-Präparationen maximal um die inserierte DNA unterscheiden, kann für alle anstehenden Sequenzanalysen im Prinzip ein einziger Primer verwendet werden, der beispielsweise direkt neben der Insertionsstelle auf der Vektor-DNA hybridisiert. Diesem Vorteil stehen jedoch auch erhebliche Nachteile gegenüber,

- denn da die Klone zufällig ausgesucht werden müssen, werden einzelne Abschnitte der Original-DNA sehr oft weit häufiger als nötig sequenziert, und

- schließlich klaffen in der mit Hilfe von geeigneten Computer-Programmen zu einer Gesamtsequenz geordneten Sammlung der Teilsequenzierungsergebnisse häufig beträchtliche Lücken, da beispielsweise gewisse Abschnitte der zu analysierenden Original-DNA "schwer klonierbar" sind.

Strategie 2: Die Mehr-Primer-Methode. Die zu sequenzierende DNA wird hier nicht wie bei Strategie 1 nach der Schrotschuß-Methode, sondern gezielt progressierend analysiert. Der in einem Experiment noch sicher zu entschlüsselnde Sequenzabschnitt dient zur Auswahl einer Primer-Anheftungsstelle für das nächste Experiment und so fort. Der Vorteil dieser Methode liegt vor allem darin, daß unnötige Mehrfachsequenzanalysen wie bei der Strategie 1 vermieden werden. Der wohl wesentliche Grund, warum diese Methode nicht allein für die Analyse langer DNA-Abschnitte verwendet wird, liegt in der Beschränkung durch die gegenwärtig verfügbaren Methoden zur chemischen DNA-Synthese.

Es hat nicht an Versuchen gefehlt, die jeweiligen Nachteile der oben beschriebenen Verfahren zu mildern, beispielsweise durch das "Multiplex-Sequencing" bei Strategie 1 und das simultane progressierende Sequenzieren von verschiedenen Stellen aus bei Strategie 2. Ein Weg, den wesentlichen Nachteil der Strategie 2 ganz zu beseitigen, liegt theoretisch darin, eine Bank aller denkbaren Primer anzulegen. Dies ist jedoch durch direkte chemische Synthese praktisch nicht möglich, da es allein  $4^{24}$  verschiedene Primer der Kettenlänge 24 gibt.

Erfindungsgemäß wird daher vorgeschlagen, kürzere, chemisch synthetisierte Oligonucleotide zu verwenden. Da jede längere Sequenz im Prinzip aus zwei oder mehr kürzeren Sequenzen zusammensetzbar ist, werden die dem gewünschten Primer entsprechenden



kurzen Oligonucleotide anstelle des gewünschten Primers zu der zu sequenzierenden DNA gegeben und durch eine

geeignete Prozedur, beispielsweise mit T4-DNA-Ligase, zu dem gewünschten Primer zusammengefügt. Die Sequenzierungsreaktion kann dann anschließend praktisch unter Standardbedingungen durchgeführt werden.

Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe wird durch die Gegenstände der Ansprüche gelöst.

#### Beispiel 1

In typischen Experimenten wurden ca. 2,5 pMol DNA des Plasmids pTZ18R (Pharmacia-LKB) mit NaOH denaturiert, mit Ethanol gefällt, getrocknet und in Wasser aufgenommen. Die DNA-Lösung wurde mit je 2,5 pMol zweier verschiedener Oligonucleotidlösungen versetzt. Die Oligonucleotide der Kettenlänge 8 (Octamere) waren derart gewählt, daß sie unmittelbar benachbart auf einem Abschnitt bekannter Nucleotidsequenz der Plasmid-DNA hybridisieren konnten. Das 5'-Ende des im hybridisierten Zustand benachbart zum 3'-Ende des anderen Oligonucleotids gelegenen Octamers war zuvor nach gängigen Verfahren mit T4-Polynucleotid-Kinase und ATP phosphoryliert worden. Nach Einstellen der bekannten Pufferbedingungen für Ligationen mit T4-DNA-Ligase und Versetzen mit 1 Einheit des Enzyms wurde die Lösung (10 µl Endvolumen) 4 h lang bei 15 °C inkubiert. Diese Ligationslösung wurde vor der Sequenzierung 5 min lang bei 37 °C aufbewahrt, um möglichst viele durch Ligation entstandene 16-mere und möglichst wenige 8-mere hybridisieren zu lassen.

Die folgende Sequenzierung sollte dazu dienen, die Sequenz des gewählten Vektors zu überprüfen. Für die Sequenzierungsreaktion nach dem Standardprotokoll der Firma United States Biochemical Corporation (USB) wurden 8 µl der Ligationslösung eingesetzt. Abweichend von diesem Protokoll wurde auf das "Annealing" von Templat und Primer verzichtet.

Sofern die genannte Phosphorylierung in Gegenwart von [gamma-<sup>32</sup>P]ATP durchgeführt worden war, wurde auf die spätere Verwendung von [α-<sup>32</sup>P]dATP verzichtet.

## Patentansprüche

1. Oligonucleotidbank, umfassend alle denkbaren  $4^6$  verschiedenen hexameren Oligonucleotide.
2. Oligonucleotidbank, umfassend alle denkbaren  $4^7$  verschiedenen heptameren Oligonucleotide.
3. Oligonucleotidbank, umfassend alle denkbaren  $4^8$  verschiedenen octameren Oligonucleotide.
4. Oligonucleotidbank, umfassend alle denkbaren  $4^9$  verschiedenen Oligonucleotide.
5. Verfahren zur DNA-Sequenzierung nach der Mehr-Primer-Methode, dadurch **gekennzeichnet**, daß man
  - (a) bei der zu sequenzierenden DNA eine einzelsträngige Primeranheftungsstelle bekannter Sequenz wählt,
  - (b) auf dieser Primeranheftungsstelle unmittelbar benachbart zwei hexamere, heptamere oder octamere Oligonucleotide (beispielsweise einer Oligonucleotidbank gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 4) hybridisiert und
  - (c) ggf. gleichzeitig mit Stufe (b) oder nach Stufe (b) ein weiteres hexameres, heptameres oder octameres Oligonucleotid (beispielsweise einer Oligonucleotidbank gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 4) unmittelbar benachbart zu

einem der beiden anderen Oligonucleotide auf der Primeranheftungsstelle hybridisiert und

(d) die Oligonucleotide zu einem Primer ligiert.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch **gekennzeichnet**, daß man auf der Primeranheftungsstelle zwei Oligonucleotide hybridisiert und miteinander zu einem Prä-Primer ligiert und erst danach auf der Primeranheftungsstelle ein drittes Oligomeres hybridisiert und mit dem Prä-Primer ligiert.

7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, dadurch **gekennzeichnet**, daß man für die Primerbildung hexamere, heptamere und/oder octamere Oligonucleotide verwendet.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch **gekennzeichnet**, daß man Oligonucleotide verwendet, die an ihrem 5'-Ende, sofern dieses Ende mit einem benachbarten Oligonucleotid mit Hilfe von T4-DNA-Ligase ligiert werden soll, phosphoryliert sind.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch **gekennzeichnet**, daß man nach der Ligation und vor der Sequenzierung nicht zum gewünschten Primer ligierte Oligonucleotide durch Wärmebehandlung entfernt.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 89/00579

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (if several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int.Cl. <sup>4</sup> : C12Q 1/68; C12N 15/00		
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl. <sup>4</sup>	C12Q; C12N	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <sup>9</sup></b>		
Category *	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
Y	"Pharmacia Molecular Biological Catalogue" May 1986, Rahm, (Lund, SE) see pages 95 - 107 -----	1-4
Y	DE, A, 3312929 (GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG) 08 December 1983 see page 7, lines 11 - 30 ---	1-4
A	DNA vol. 3, No. 4, 1984, M. A. Liebert, Inc., (New York, US) pages 339 - 343; R. Sanchez-Pescador et al.: "Laboratory methods. Use of unpurified synthetic deoxynucleotide primers for rapid dideoxynucleotide chain termination sequencing" see abstract ---	
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Special categories of cited documents: <sup>10</sup></p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
21 December 1989 (21.12.89)	08 February 1990 (08.02.90)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
European Patent Office		

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

V. ☐ OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND ~~NOT~~ **not** fully searchable

This International search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:

1. ☐ Claim numbers ..... because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claim numbers 1-9... because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Neither the description nor the claims disclose the invention in a sufficiently clear manner for it to be carried out by a person skilled in the art (PCT Article 5). A meaningful search could therefore not be carried out (PCT Article 17.2 (a) (ii)).

3. ☐ Claim numbers ..... because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).

VI. ☐ OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING <sup>2</sup>

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application.

2. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:

3. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:

4. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, the International Searching Authority did not invite payment of any additional fee.

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## SA 29005

The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 06/02/90

EPO FORM P0479

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

<b>I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS</b> (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) <sup>6</sup>		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
Int.Kl. 4 C12Q1/68 ; C12N15/00		
<b>II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE</b>		
Recherchierter Mindestprüfstoff <sup>7</sup>		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int.Kl. 4	C12Q ; C12N	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehorende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen <sup>8</sup>		
<b>III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN</b> <sup>9</sup>		
Art. <sup>9</sup>	Kennzeichnung der Veröffentlichung <sup>11</sup> , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile <sup>12</sup>	Betr. Anspruch Nr. <sup>13</sup>
Y	"Pharmacia Molecular Biological Catalogue" Mai 1986, Rahm, (Lund, SE) siehe Seiten 95 - 107 ---	1-4
Y	DE,A,3312929 (GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG) 08 Dezember 1983 siehe Seite 7, Zeilen 11 - 30 ---	1-4
A	DNA vol. 3, no. 4, 1984, M. A. Liebert, Inc., (New York, US) Seiten 339 - 343; R.Sanchez-Pescador et al.: "Laboratory methods. Use of unpurified synthetic deoxynucleotide primers for rapid dideoxynucleotide chain termination sequencing" siehe Zusammenfassung ---	5
<p><sup>9</sup> Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen <sup>10</sup> :</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"I" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
<b>IV. BESCHIEINIGUNG</b>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts	
21.DEZEMBER 1989	08 FEB 1990	
Internationale Recherchenbehörde	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten	
EUROPAISCHES PATENTAMT	T.K. WILLIS	



## WEITERE ANGABEN ZU BLATT 2

## V. BEMERKUNGEN ZU DEN ANSPRÜCHEN, DIE SICH ALS unvollständig recherchierbar erwiesen haben

Gemäß Artikel 17 Absatz 2 Buchstabe a sind bestimmte Ansprüche aus folgenden Gründen nicht Gegenstand der internationalen Recherche gewesen:

1. ☐ Ansprüche Nr. ...., weil sie sich auf Gegenstände beziehen, die zu recherchieren die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

2. ☒ Ansprüche Nr. 1-9 ...., weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich

Der Erfindung ist nicht deutlich in der Beschreibung oder Patentansprüche zu offenbaren, dass ein Fachman Sie danach ausführen kann (Art. 5, PCT). Für diesen Grund war eine sinnvolle Recherche nicht möglich (Art. 17.2 (a)(ii) PCT).

3. ☐ Ansprüche Nr. ...., weil sie abhängige Ansprüche und nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) PCT abgefaßt sind.

VI. BEMERKUNGEN BEI MANGELNDER EINHEITLICHKEIT DER ERFINDUNG<sup>2</sup>

Die Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich der internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.

2. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich der internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren gezahlt worden sind, nämlich

3. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; sie ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

4. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche eine Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde eine solche Gebühr nicht verlangt.

Bemerkung hinsichtlich eines Widerspruchs

☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

